

## 조혈모세포로부터 적혈구 분화에 사용되는 무혈청 배지의 성능 비교

김지연 · 김신영 · 전유라 · 최용욱 · 김현옥

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

### Comparison of Serum-Free Media in RBC Differentiation from Human Hematopoietic Stem Cells

Ji Yeon Kim, Sinyoung Kim, You La Jeon, Yongwook Choi, Hyun Ok Kim

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Research on RBC production from hematopoietic stem cells has been conducted competitively in many countries. However those were *in vitro* successes and many hurdles still remain for large scale transfusable RBC production from stem cells. A need for large volume of culture media is a crucial factor for culture condition which researchers must overcome. In this study, we evaluated the efficiency of two commercial serum-free media, StemPro<sup>®</sup>-34 SFM and Stemline II hematopoietic stem cell expansion medium, in RBC differentiation from cord derived stem cells.

**Methods:** We cultured cord derived CD34<sup>+</sup> cells *in vitro* and evaluated over the periods of 7 days, 14 days, 17 days and 21 days in culture for expanded cell count, cell morphology and differential count using the Wright Giemsa stain.

**Results:** Cell expansion and RBC differentiation developed rapidly in Stemline media compared to StemPro media. Enucleated RBCs were observed at 10~14 culture days and orthochromatic erythroblasts were shown up to 50 % among culture cells at 17 days in Stemline media. The enucleated RBCs were observed at 17 days in StemPro Media. Although the erythroblasts in StemPro media are slow at differentiation, they maintain continuous expansion up to 21 days.

**Conclusion:** In Stemline media, the expansion and differentiation to mature RBCs are processed much faster, but the cell condition slows down after 17 days. In the RBC production aspects, Stemline media is better than StemPro media as a rapid differentiation because it reduces the cost due to *in vitro* short culture duration. (Korean J Blood Transfus 2015;26:18-25)

**Key words:** Serum-free media, Hematopoietic stem cells, RBC differentiation

Received on December 5, 2014. Revised on December 19, 2014. Accepted on December 23, 2014

Correspondence to: Hyun Ok Kim

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

Tel: 82-2-2228-2444, Fax: 82-2-313-0956, E-mail: hyunok1019@yuhs.ac

This study was supported by a grant of the Korean Health Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HI10C1740).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.  
Copyright ©2015 The Korean Society of Blood Transfusion

## 서론

세포를 체외배양으로 증폭시키는 경우 배지의 성분 조성이 중요하다. 그러나 상품으로 시판되고 있는 특정배지의 성분조성은 회사마다 특허로 보호되고 있으며, 이 배지 조성물에 따라 체외배양을 할 때 세포의 생존과 세포수의 증가에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup>

제대혈을 이용한 조혈모세포이식에서 이식의 활성화를 저해하는 가장 큰 요소는 제대혈내 포함되어 있는 줄기세포의 절대량이 적어 이식 대상이 소아 연령군으로 한정되는 것이다. 따라서 체외에서 증폭시킨 CD34 양성세포가 그 기능을 유지하는 경우 제대혈 이식 적용 대상자를 성인까지 확대할 수 있기 때문에 조혈모세포의 체외 증폭에 관한 연구가 많이 진행되고 있다.<sup>2,3)</sup> 그러나 각종 조혈성장인자의 병용으로 단기간의 액체 배양만으로도 조혈세포의 대량 증폭은 가능하나 조혈성장인자에 의존하는 경우 조혈모세포의 자기갱신을 유도하는 세포증식보다는 성숙한 세포로의 분화 가능성이 크며, 상당 부분의 조혈모세포가 세포사멸에 빠지게 됨으로서 조혈모세포의 증폭은 실험적으로 가능하나 임상적용이 어렵다는 한계에 도달하게 되었다.

일반적으로 세포를 배양할 때는 IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco, Carlsbad, CA, USA) 또는 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco, USA) 등의 기본 배지에 필요한 첨가물(supplement), 10% 우태아혈청 및 분화 특이성을 갖는 사이토카인을 첨가하여 분화 배지로 사용한다. 그러나 최근에는 제대혈, 골수 농축액 또는 G-CSF로 가동화시킨 말초혈액에서 내피기원세포(endothelial progenitor cell)를 분리하고 증폭시키는 EGM-2 (Endothelial cell growth medium, Lonza, Walkersville, MD, USA) 기본배지 또는 중

간엽줄기세포의 분리 배양에 좀 더 효율적인 MSGM (Mesenchymal stem cell growth medium, Lonza) 배지 등 조혈모세포의 증폭을 위한 특정 배지가 상품화되어 시판되고 있다. 실제 내피기원세포나 마우스 등에서의 중간엽줄기세포를 배양해야 하는 경우 초기에 EGM 또는 MSGM 배양 배지를 사용하는 경우 그 분리효율이 높음은 이미 보고된 바 있다.<sup>4)</sup>

세계적으로 조혈모세포로부터 적혈구로 분화시키는 연구는 프랑스의 Neildez-Nguyen 등<sup>5)</sup>에 의해 2002년 처음 보고되었고 최근에는 일본, 미국, 영국, 호주, 한국 등에서 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>6-14)</sup> 이때 수혈용 성숙적혈구를 대량 생산하기 위해 CD34 양성세포를 조혈모세포 단계에서 대량 증폭시킨 후 적혈구로 분화시키거나 분화되는 적혈구아세포에서 세포사멸을 통해 없어지는 세포를 줄이는 두 방향으로 연구를 진행하고 있다.

물론 수혈용 혈액의 대량생산을 위해 세포 증식을 유도하는 다양한 경로를 자극 또는 차단시키는 저분자 화합물의 필요성이 대두되고 있으며 3D culture system, 나아가서는 생물반응장치(bioreactor)를 이용하는 방법 등이 제안되고 있다.<sup>15,16)</sup> 그러나 아직까지는 *in vitro* 실험실 단계이며, 실용화되기까지는 수년은 걸릴 것으로 예상된다. 또한 이런 생물반응장치를 이용하는 경우 많은 양의 배지가 필요하며, 이에 필요한 첨가물과 사이토카인 사용량의 증가는 생산수가를 올려 고비용 저효율 생산성의 결정 요소가 된다. 따라서 본 연구에서는 검사실에서 만드는 자가 제조 배지의 제조회차당 변화(batch to batch variation) 한계를 극복하고 대량 생산을 위한 대용량 배지를 확보하기 위해 시판되고 있는 조혈모세포의 대표적인 증식배지인 StemPro<sup>®</sup>-34 SFM (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA 이하 StemPro로 표기)과

Stemline II hematopoietic stem cell expansion medium (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA 이하 Stemline으로 표기)을 사용하여 제대혈유래 줄기 세포로부터 적혈구 분화를 시도하여 두 배지의 효율을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 제대혈로부터 CD34 양성세포 분리

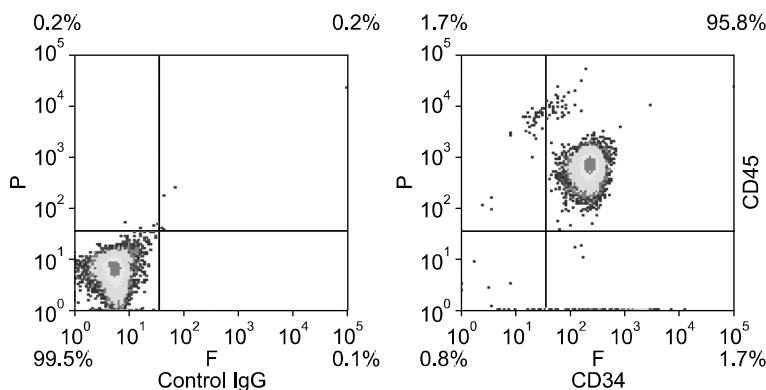
제대혈은 정상 분만 산모의 동의를 얻어 분만 후 태반이 반출되기 전 탕줄의 정맥혈을 통해 채취하였다. CPDA 항응고제가 들어있는 제대혈백(녹십자(주), 용인, 한국)을 사용하여 무균적으로 채취하였으며(IRB 승인번호: 4-2011-0081) 분만 후 6시간 이내에 Ficoll-Hypaque (density, 1.077; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 사용하여 단핵세포를 분리하고 이를 MediMACS와 MiniMACS 시스템(Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)을 이용하여 두번에 걸쳐 CD34 양성세포를 분리 하였으며 순도가 95% 이상인 경우의 세포만을 실험에 사용하였다(Fig. 1).

CD34 양성세포수는 Stem-kit<sup>®</sup> (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA)로 CD45-FITC, CD34-PE

에 대한 단클론성 항체를 이용하였고, 유세포분석기 EPI-CS<sup>®</sup>XL (Beckman Coulter Inc.)로 분석하였다.

### 2. 제대혈 유래 CD34 양성세포로부터 적혈구로의 분화실험

제대혈 유래 CD34 양성세포로부터 적혈구의 분화실험에서의 기본 배지는 제조회사에서 배지와 동시에 공급하는 첨가물을 혼합한 StemPRO 배지와 Stemline 배지를 각각 사용하여 이미 보고하였던 방법에 따라 4단계로 나누어 진행하였다.<sup>12,13)</sup> 1단계는 CD34 양성세포를  $5 \times 10^4$ /mL의 농도로 맞춘 후(cell count를 맞춤) 12 well 배양용기(Nunc, Rochester, NY, USA)에 1 mL씩 분주하였다. 그리고 기본 배지에 동일하게 Stem cell factor (SCF, Peprotech, Rehovot, Israel) 100 ng/mL, Interleukin-3 (IL-3, Peprotech) 10 ng/mL와 recombinant Erythropoietin (EPO RecormonEpoetin beta, Roche, Mannheim, Germany) 6 IU/mL을 첨가하였다. 액상배지는 1주일에 두번 갈아주었다. 그 다음 1주일간은 IL-3 농도는 그대로 10 ng/mL를 유지하였으나 SCF는 50 ng/mL, EPO는 3 IU/mL로 줄여 배양하였다. 배양 14일 후에는 SCF 50 ng/mL와 EPO는 2 IU/mL를 첨가하여 배양하였다. hydrodynamic stress로부터 세포막을 보호하는 0.05%



**Fig. 1.** The purity of cord blood CD34+ cells after double MACS separation. We used the CD34+ cells, which was  $\geq 95\%$  purity, for differentiation of cultured matured RBCs.

poloxamer 188 (Pluronic F68 [F68], Sigma Chemical Co., St Louis, MO; MW 8400. nonionic block copolymer chemical surfactant)를 첨가하였다. 마지막 4일간은 모든 사이토카인을 빼고 기본 배지에 poloxamer 188만 넣고 배양하였다(Table 1).

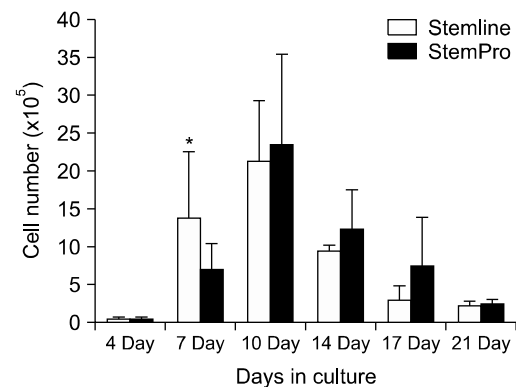
### 3. 세포수 측정

배양은 CD34 양성세포  $5 \times 10^4/\text{mL}$ 로 시작하였다. CD34 양성세포를 배양 4일, 7일, 10일, 14일, 17일, 21일에 hemocytometer를 사용하여 세포수를 수기로 측정하였다. 두 배지에서의 배양된 세포수의 통계는 Excel (Microsoft) program으로 student *t* test로 처리하였으며  $P < 0.05$ 를 통계적 차이가 있는 것으로 해석하였다.

### 4. 세포형태 및 백분율 측정

배양 14일, 17일, 21일에 각각 도말 슬라이드를 만들었으며, Wright Giemsa 염색하에 현미경으로 세포의 형태와 백분율을 산정하였다.

$10^5/\text{mL}$ 로 세포수가 늘어나지 않았으나 배양 7일째에는  $13.85 \pm 8.69 \times 10^5/\text{mL}$ 로 약 26배, 10일째에는  $21.35 \pm 7.99 \times 10^5/\text{mL}$ 로 증폭배수가 43배였다. 14일에는 세포수가  $9.5 \pm 0.71 \times 10^5/\text{mL}$ 로 19배 증가로 10일째의 증가 속도보다 낮아지기 시작하였으며, 17일째는  $2.9 \pm 1.84 \times 10^5/\text{mL}$ 로 6배, 21일에는  $2.25 \pm 0.49 \times 10^5/\text{mL}$ 로 4.5배 세포수 증가를 보였다. StemPro 배지에서는 4일째까지 거의 세포 증식은



**Fig. 2.** Comparison of the expansion of erythroid cells between in Stemline II media and in StemPro media. The cells were counted using a hemocytometer ( $\times 10^5/\text{mL}$ ) and averaged for all 3 wells in each condition (N=3). There is a statistically difference at 7 days in culture (\* $P < 0.05$ ).

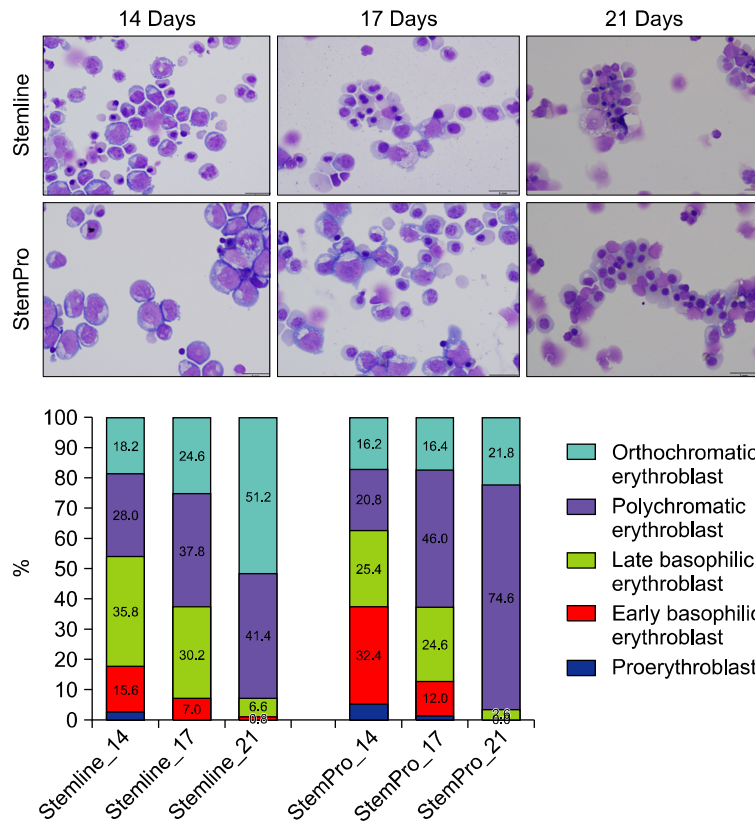
## 결 과

### 1. 세포수의 측정

Stemline 배지에서 배양 4일째에는  $0.55 \pm 0.07 \times$

**Table 1.** Formulation in expansion and differentiation media

Culture Parameter	Phase I 0 ~ 7 days	Phase II 7 ~ 14 days	Phase III 14 ~ 17 days	Phase IV 17 ~ 21 days
$1 \times 10^{-6}$ M hydrocortisone	+	—	—	—
Stem cell factor (SCF, ng/mL)	100	50	50	—
Interleukin 3 (IL-3, ng/mL)	10	10	—	—
Erythropoietin (EPO, IU/mL)	6	3	2	—
0.05% F68	—	—	+	+
Basic Supplement	50 ng/mL human transferrin, 90 ng/mL ferric nitrate, 50 $\mu\text{g/mL}$ insulin, 2 mM glutamine, 30.8 $\mu\text{M}$ vitamin C, 160 $\mu\text{M}$ monothioglycerol, 2 $\mu\text{g/mL}$ cholesterol			



**Fig. 3.** Comparison of cell morphological changes and differential count in the different culture media. H-E stain ( $\times 1000$ ). CD34+ cells selected from cord blood were cultured for 21 days *in vitro*. This slide showed the representative case.

없었으며, 7일째에는  $6.9 \pm 3.54 \times 10^5/\text{mL}$ 로 13배 증가하여 Stemline에 비해 초기 증가속도가 늦었으나, 10일째부터는  $23.5 \pm 12.02 \times 10^5/\text{mL}$ 로 47배 증가하였으며 14일, 17일, 21일 각각  $12.4 \pm 5.09 \times 10^5/\text{mL}$  (25배),  $7.45 \pm 6.4 \times 10^5/\text{mL}$  (15배),  $2.5 \pm 0.56 \times 10^5/\text{mL}$  (5배)로 Stemline에 비해 그 증폭배수를 높게 유지하였다(Fig. 2).

## 2. 세포형태 및 백분을 변화

Stemline 배지에서는 빠르게 분화가 진행되어 10일째부터 탈핵을 한 성숙적혈구가 관찰되기 시작하였으며 배양 17일째는 50% 이상의 정색소성 적혈구아세포(orthochromatic erythroblast)가 관찰

되었다. 그러나 빠르게 세포수가 증가하고 분화하는 대신 배양 후반부에서는 적혈구 전구세포의 binucleation 또는 megaloblastic maturation 등 형태학적 이상이 관찰되었다. StemPro 배지에서는 적혈구로의 분화가 천천히 진행되었지만 배양 21일까지 세포의 형태는 Stemline 배지에 비해 잘 유지되면서 계속 분화하는 양상이 관찰되었다(Fig. 3).

## 고 찰

수혈을 통한 감염원의 종류가 증가하고 있으며, 최근 세계적으로 노령화 인구의 증가와 젊은 층의 감소로 혈액의 부족 현상은 예측되고 있다.

덴마크의 경우 수혈량의 76%가 65세 이상의 환자에서 사용되고 있으며<sup>16)</sup> 국내에서도 점점 노령 인구 증가에 의한 수혈량이 증가할 것으로 예상된다. 또한 수혈전과 감염에 대한 선별검사로 NAT 검사까지 도입되면서 그 어느때보다도 안전성이 확보되고 있지만<sup>17)</sup> 2008년 전세계적으로 채혈된 9천 2백만 건의 혈액 중 절반만이 검사가 가능한 선진국에서 채혈된 것인데, 이는 전세계 인구의 15% 밖에 해당하지 않는 수치로 아직도 많은 경제 빈곤국에서는 수혈로 인한 감염의 위험성에 노출되어 있다.<sup>15)</sup> 과거부터 이를 극복하기 위해 인공혈액 생산에 대한 연구가 진행되었으며, 대부분의 연구가 혈액소 기반 산소운반체와 산소 친화력이 있는 perfluorocarbene 용액이었는데 임상시험에서 각종 부작용의 발생으로 아직도 상용화된 인공혈액은 개발되고 있지 못하다.<sup>18)</sup> 한편 이런 종류의 인공혈액과는 다른 세포 기반 적혈구 생산기술이 2002년 Neildez-Nguyen 등<sup>5)</sup>에 의해 소개되어 인공혈액 생산에 새로운 전기를 마련하게 되었다. 조혈모세포인 CD34 양성 세포는 주로 골수에서 있으면서 일생 우리 몸의 혈액을 생산하는 조혈세포를 생산하게 된다. 조혈모세포원으로서 CD34 양성세포는 골수 외에도 제대혈, 조혈모세포 성장인자로 가동화 한 말초혈액, 그리고 아주 소량이지만 말초 혈액에서도 관찰된다. 이러한 조혈모세포를 이용하여 실험실에서 정상 적혈구와 비슷한 혈액소 농도와 일정기간 수명을 지닌 성숙 적혈구로의 완전한 분화 성공은 2005년에 이루어졌고<sup>19)</sup> 이어서 같은 연구 그룹에 의해 체외 생산된 적혈구로 수혈을 할 수 있음을 증명한 임상시험이 보고되었다.<sup>20)</sup> 다만 제대혈이나 골수에서의 CD34 양성세포로부터의 적혈구 생산량은 아직은 검사실 수준이기 때문에 1회 헌혈로 얻을 수 있는 적혈구 한 단위의 양을 생산하기에는 아직 그 기술력이 못미치

고 있다. 세계적으로 이미 배아줄기세포로부터, 유도 만능줄기세포로부터 최종 성숙단계의 적혈구로의 분화까지는 이미 성공한 기술로,<sup>21,22)</sup> 줄기세포기반 적혈구 생산기술은 수혈의학 분야에서 유망한 연구 과제임에는 틀림없으나 아직도 많은 단계에서 극복해야 할 새로운 기술 수요가 있다. 그러나 아직까지 헌혈 혈액을 대체할 수 있는 충분한 양의 수혈용 적혈구 생산까지의 기술은 확보되어 있지 못하므로 앞으로의 연구는 비용효과적인 측면에서 대량생산 기술에 그 연구가 집중될 것으로 예측되고 있다. 즉 한 단위의 적혈구 생산을 위해서는 적어도  $2 \times 10^{11}$ 개의 적혈구를 생산해야 하는데 현재까지의 세계적인 기술은 최대  $10^8$  정도까지의 체외 증폭기술이기 때문에 이 한계를 극복하기 위해 제시된 방법이 기존의 2D culture system 에서 3D culture system 연구로 옮겨가고 있으며 이때 생물반응장치를 이용하는 기술로 그 연구방향이 집중되고 있다.<sup>15)</sup> 그러나 체외 배양 과정에 드는 비용은 사실상 실용화하기 어려울 정도로 고가이고  $10^{10}$ 개의 적혈구를 체외배양하기 위해서는 13 L 이상의 배지가 필요하기 때문에<sup>16)</sup> 이때 가장 중요한 것이 배지의 개발이다. 물론 각 연구실 마다 사용하는 배양액이나 사이토카인 등의 첨가 물질의 농도와 종류가 조금씩은 차이가 나지만 대부분 유사성을 갖고 있으며<sup>23)</sup> 최근 특수배지로 조혈모세포 증식 배지가 상용화 되어 StemPro와 Stemline이라는 두 종류의 배지가 소개되고 있다. 따라서 과거에 일반적으로 IMDM 기본 배지에 10% 우태아혈청을 사용하던 것을 무혈청 배지인 두 상용화 배지를 주로 사용하게 되면서 두 배지가 기존의 검사실에서 배양에 사용된 배지에 비해 세포의 증식속도 유지와 적혈구 분화율이 우수함을 알 수 있었다. 다만 본 연구 결과 StemPro 배지는 조혈모세포의 분화능이 조금 늦게 나타나고 더 오랜 기간 세포증식

을 보여주었으나 Stemline은 좀더 빨리 세포수의 증가를 보이면서 성숙적혈구의 분화가 이루어져서 Stemline 배지가 적혈구로의 분화를 빨리 유도하여 체외배양 기간을 감소시키는 장점으로 해석하였다. 그러나 두 배양배지의 실제 조성은 완전히 공개되지는 않았다. 따라서 StemPro는 조혈모세포의 증폭배지로서, Stemline은 적혈구 분화배지로서 더 적합하다고 판단되었으며 이 기준에 따라 적혈구 분화 배지의 선택은 그 목적에 따라 선택할 수 있을 것이다. 결론적으로 본 연구에서는 두 상용화 배지의 사용목적에 따라 선택할 수 있는 특징을 제시하였다.

## 요 약

**배경:** 각 나라에서의 줄기세포 기반 적혈구 생산기술에 대한 연구의 경쟁이 치열하다. 그러나 시험관내 소량 생산의 성공이며, 실제 수혈을 위한 적혈구의 대량생산은 아직 성공하지 못한 기술이며 이중 비용효율적인 면에서 가장 중요한 요소가 배지의 선택이다. 본 연구에서는 적혈구 대량 생산을 위해 대표적인 조혈모세포 증식배지인 StemPro<sup>®</sup>-34 SFM과 Stemline II hematopoietic stem cell expansion medium을 사용하여 제대혈유래 줄기세포로부터 적혈구 분화를 시도하여 두 배지의 효율을 평가하고자 하였다.

**방법:** 제대혈로부터 CD34 양성세포를 분리하여 두개의 상업용 무혈청 배지를 기본으로 하여 적혈구 분화 실험을 진행하였다. 21일간 적혈구로 분화시키면서 7일부터 일주일 간격으로 21일까지 4회 hemocytometer를 사용하여 수기로 세포수를 산정하였으며, 말초도말 슬라이드를 제작하여 세포의 형태 변화와 적혈구 분화를 백분율로 비교하였다.

**결과:** Stemline 배지에서는 빠르게 분화가 진행

되어 10~14일째부터 탈핵을 한 성숙적혈구가 관찰되기 시작하였으며 배양 17일째는 50% 이상의 정색소성 적혈구아세포(orthochromatic erythroblast)가 관찰되었다. StemPro 배지에서는 성숙적혈구가 17일이 되어서야 많이 관찰되기 시작하였다. 그러나 StemPro 배지에서는 적혈구로의 분화가 천천히 진행되었지만 배양 21일까지 세포의 형태는 Stemline 배지에 비해 잘 유지되면서 계속 분화하는 양상이 관찰되었다.

**결론:** StemPro 배지는 조혈모세포의 분화능이 조금 늦게 나타나고 더 오랜 기간 세포증식을 보여주었다. Stemline은 좀더 빨리 세포수의 증가를 보이면서 성숙적혈구의 분화가 이루어졌으나 배양 17일 부터는 세포의 형태나 숫자의 증가가 둔화되었다. 따라서 Stemline은 배양기간을 줄여 짧은 기간 동안에 성숙 적혈구를 얻을 수 있기 때문에 적혈구 분화배지로서 더 적합하다고 판단되었다.

## References

1. Hannoun Z, Fletcher J, Greenhough S, Medine C, Samuel K, Sharma R, et al. The comparison between conditioned media and serum-free media in human embryonic stem cell culture and differentiation. Cell Reprogram 2010;12: 133-40
2. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. Blood 2013;122:491-8
3. Cord blood banking introduction-State of the art. Monaco: The World Marrow Donor Association, 2013. <http://www.esh.org/wp-content/uploads/2013/11/Session-V-State-of-the-art.pptx-Lecture-seule.pdf> [Online] (last visited on 18 Dec 2014).
4. Kim HS, Heo JS, You J, Park T, Choi Y, Kim E, et al. Fast and efficient isolation of mouse

- bone marrow-derived mesenchymal stem cells by using a biocompatible polymer. *Tissue Eng Regen Med* 2010;7:443-51
5. Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2002;20:467-72
6. Miharada K, Hiroshima T, Sudo K, Nagasawa T, Nakamura Y. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:1255-6
7. Nakamura Y. In vitro production of transfusable red blood cells. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2008;25:187-201
8. Defense Advanced Research Projects Agency. Defense Sciences Office. <http://www.darpa.mil/NewsEvents/Release/2013/11/12a.aspx> [Online] (last visited on 23 Feb 2014).
9. Mountford J, Olivier E, Turner M. Prospects for the manufacture of red cells for transfusion. *Br J Haematol* 2010;149:22-34
10. Mountford JC, Turner M. In vitro production of red blood cells. *Transfus Apher Sci* 2011;45: 85-9
11. Timmins NE, Athanasas S, Günther M, Buntine P, Nielsen LK. Ultra-high-yield manufacture of red blood cells from hematopoietic stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:1131-7
12. Baek EJ, Kim HS, Kim S, Jin H, Choi TY, Kim HO. In vitro clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34+ cells. *Transfusion* 2008;48:2235-45
13. Kim HO, Baek EJ. Red blood cell engineering in stroma and serum/plasma-free conditions and long term storage. *Tissue Eng Part A* 2012;18:117-26
14. Kim HO. In-vitro stem cell derived red blood cells for transfusion: are we there yet? *Yonsei Med J* 2014;55:304-9
15. Rousseau GF, Giarratana MC, Douay L. Large-scale production of red blood cells from stem cells: what are the technical challenges ahead? *Biotechnol J* 2014;9:28-38
16. Ramesh B, Guhathakurta S. Large-scale in-vitro expansion of RBCs from hematopoietic stem cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2013;41: 42-51
17. World Health Organization. Global Database on Blood Safety (GDBS). [http://www.who.int/bloodsafety/global\\_database/GDBS\\_Summary\\_Report\\_2011.pdf](http://www.who.int/bloodsafety/global_database/GDBS_Summary_Report_2011.pdf) [Online] (last visited on 18 Dec 2014).
18. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *JAMA* 2008;299: 2304-12
19. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:69-74
20. Giarratana MC, Rouard H, Dumont A, Kiger L, Safeukui I, Le Pennec PY, et al. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* 2011;118:5071-9
21. Lu SJ, Feng Q, Park JS, Vida L, Lee BS, Strausbauch M, et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008;112:4475-84
22. Lapillonne H, Kobari L, Mazurier C, Tropel P, Giarratana MC, Zanella-Cleon I, et al. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 2010;95:1651-9
23. Mountford JC, Olivier E, Jordanides NE, de Sousa P, Turner ML. Red blood cells from pluripotent stem cells for use in transfusion. *Regen Med* 2010;5:411-23